



TITLE:

野生型C型肝炎ウイルス遺伝子型
1b培養系の開発とこれを用いたそ
のゲノム複製に関する研究(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

宮山, 陽平

CITATION:

宮山, 陽平. 野生型C型肝炎ウイルス遺伝子型1b培養系の開発とこれを用いたそのゲノム複製に関する研究. 京都大学, 2020, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22606>

RIGHT:

許諾条件により本文は2020-12-19に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	宮山 陽平
論文題目	野生型 C 型肝炎ウイルス遺伝子型 1b 培養系の開発とこれを用いたそのゲノム複製に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>これまで HCV のゲノム複製の解析には、HuH7 由来細胞内で自律増殖する複製最小単位、いわゆるサブゲノムレプリコン（subgenomic replicon：SGR）が用いられてきた。しかしながら、SGR にコードされている HCV のタンパク質には、野生型 (WT) HCV には認められないアミノ酸置換、所謂 HuH7 由来細胞への適応変異（adaptive mutation：AM）が存在し、これが HuH7 由来細胞内での SGR 複製に必須であった。このことから、従来の SGR 複製が WT HCV のゲノム複製を完全に再現しているか否かについては疑問があった。近年、SEC14-like protein 2（SEC14L2）タンパク質を HuH7 細胞に外来的に産生させることで、HCV WT のゲノム複製が可能になることが報告された。そこで、これまでに不明であった HCV WT ゲノム複製機構を解析する目的で、発がん性が高く、日本における感染率が最も高い遺伝子型 1b の HCV（HCV1b）について、その SGR 複製系の開発を行った。まず、SEC14L2 タンパク質を恒常的に産生している HS 細胞を樹立し、この HS 細胞に HCV1b に分類された KT9 株の SGR WT RNA を導入し、これが複製、維持されている細胞（HS55-4 細胞）を樹立した。次に WT と AM を含む HCV ゲノムの双方が複製することができる細胞を得るために、WT HCV のゲノム複製を許容することがわかったこの細胞を抗 HCV 薬剤処理することで HCV SGR を排除した、所謂治癒細胞（cured 細胞）である HS55-4C 細胞を作製した。SGR の複製効率を簡便に検出するためのレポーターとして分泌型 Nano Luciferase（sNLuc）を含む sNLuc SGR KT9 WT と sNLuc SGR KT9 AM を作製し、HS55-4C 細胞に一過性に導入した。この後 6 日間に渡り、WT 及び AM の SGR KT9 がともに複製されることが確認された。このことから HCV 遺伝子型 1b の WT ゲノム複製を再現する実験系の開発に初めて成功したと考えられた。ここで単一の培養細胞と単一の HCV 株のゲノムを用いたこの SGR 複製系からは sNLuc SGR KT9 WT は sNLuc SGR KT9 AM に比べてゲノム複製レベルが著しく低いことが明らかになった。また、この系を用いて各種既知抗 HCV 薬剤に対する WT と AM 感受性の比較を行ったところ以下の結果を得た。HCV RNA と相互作用することで HCV ゲノム安定化と翻訳の亢進に機能する miR122 を標的にした anti-miR-122 LNA は WT と AM の双方に対して同様の阻害効果を示した。一方、HCV ゲノム複製に関わる HCV タンパク質に直接的に働きかける薬剤(Direct acting antivirals, DAA)など他のすべての抗 HCV 薬剤に対しては、WT は AM よりも総じて感受性が低いことがわかった。これは AM を含む HCV タンパク質の構造変化がその一つの原因であると考えられるが、AM を含まない NS5B によって取り込まれる抗 HCV 薬剤についても同様の感受性を示したことから、AM は HCV ゲノム複製複合体全体の構造に影響を与えている可能性が考えられた。また、HS55-4 細胞では、この細胞に由来する HS55-4C 細胞より高い SGR KT9 WT の複製効率が認められた。HS55-4 細胞は長期にわたり SGR KT9 WT が複製維持されていたことから、この細胞では SGR KT9 WT の複製に有利な環境が可逆的に形成されている可能性が考えられ、HCV ゲノム複製に関わる新たな宿主因子の存在が示唆された。</p> <p>この研究によって開発した HCV1bWT のゲノム複製系を用いることにより、これまでの自然界に存在しない HCV ゲノムを用いた実験系に比較して、感染者肝細胞における HCV ゲノム複製に、より近似した HCV ゲノム複製機構の解析が可能になった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、C型肝炎ウイルス(HCV)単一株由来の野生型(WT)ゲノムと培養細胞適応変異型(AM)ゲノムが単一の培養細胞において複製する、これまでにない新たな実験系を構築することによって、既存の HCV AM ゲノムを用いた HCV ゲノム複製系では分からなかった HCV WT ゲノムの複製様式を示した論文である。

これまで HCV ゲノム複製の研究は、自然界には存在しない AM が導入された HCV ゲノムを用いて行われてきた。患者に感染している WT HCV には AM に相当するアミノ酸変異は全く認められず、しかしながら、各種培養細胞では AM のない WT HCV のゲノム複製は認められなかった。近年、vitamin E の輸送に関わる SEC14L2 が培養細胞における WT HCV のゲノム複製を可能にする宿主因子であることが報告された。そこで本研究では、発がん性が高く、日本で最も感染率の高い遺伝子型 1b の WT HCV ゲノム複製機構を解明することを目的にして、SEC14L2 を恒常的に発現させた培養細胞を作製し、この細胞でその部分ゲノム複製単位 (Subgenome replicon、SGR)が複製する培養細胞系の構築を行った。WT 及び AM 双方の複製を許容する一つの細胞株を得るために、まず恒常的に WT HCV の SGR が複製している、所謂、レプリコン細胞を樹立し、抗 HCV 薬剤を用いてこのレプリコン細胞からその SGR を排除した、所謂、Cured 細胞を作製した。AM が存在するゲノムと WT ゲノムの複製機構の相違を検討するために、単一の HCV1b 株由来の SGR を作製し、Cured 細胞に一過性に導入することで、双方のゲノム複製を同じ条件で比較することが可能な実験系の構築に成功した。この実験系を用いた研究から以下のことが明らかとなった。AM を含むものより WT の HCV1b SGR の複製効率が著しく低かった。また、各種抗 HCV 薬の中で HCV ゲノム複製に関わる HCV タンパク質を標的にしたすべての抗 HCV 薬に対する感受性は、その標的タンパク質に AM が存在するかしないかに関わらず、WT ゲノムの方が低かった。これらの結果は、実際の HCV 感染患者内での HCV ゲノム複製や薬剤感受性と類似した傾向を示していた。

以上の結果は、新たに開発した WT HCV1b ゲノム複製系が、患者内の HCV ゲノム複製に比較的類似している可能性を示すものであり、WT HCV ゲノム複製を解析するのに有用な実験系であることを示したものである。これまで、本来の WT HCV ゲノム複製に関しては不明な点が多く、その制御機構も明らかにされていなかった。この論文において、申請者はその研究を可能にする実験系の開発に成功している。

本論文はウイルス学に関する高度で幅広い学識と優れた研究能力を示している。また生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念を提示が示されており、理論的かつ一貫性をもって記述されている。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文としての価値あるものと認めた。さらに令和2年1月28日に公聴会を実施し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 平成 年 月 日